Über die herzwirksamen Krötengiftstoffe.

Über das Vorkommen von Pflanzensterinen in Kröten.

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt
im Oktober 1938

von
Hans Behringer
aus München.

Berichterstatter: Geheimrat Prof. Dr. H. Wieland
Tag der mündlichen Prüfung: 10. November 1938


R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Sonderabdruck aus Hoppe-Seyler's Ztschr. f. physiolog. Chem. **245.** Bd. (1937).

Über das Vorkommen von Pflanzensterinen in Kröten.

Von

Rudolf Hüttel und Hans Behringer[1].

(Aus dem Chemischen Laboratorium der Bayer. Akademie der Wissenschaften, München.)

(Der Schriftleitung zugegangen am 16. Dezember 1936.)

E. Faust[2] hat im Jahre 1902 aus dem alkoholischen Extrakt der Häute der einheimischen Kröte (Bufo vulgaris) einen Stoff vom Schmelzp. 152° isoliert, den er Bufonin nannte und den er neben dem von ihm gleichfalls isolierten Bufotalin als einen Träger der Giftwirkung des Krötensekrets ansah. G. Bertrand[3]) konnte dann nachweisen, daß das Bufonin mit etwas Bufotalin verunreinigtes Cholesterin war. K. K. Chen, H. Jensen und A. L. Chen[4]) haben dann bei fast allen von ihnen untersuchten Krötenarten im Sekret ein Sterin gefunden, das sie als Cholesterin („a cholesterol") bezeichneten.

Im Laufe unserer Untersuchungen über die Giftstoffe von Bufo vulgaris[5]) erhielten wir aus den petrolätherlöslichen Fraktionen ebenfalls ein Sterin, das sich aber bei näherer Prüfung als Phytosterin, im wesentlichen wohl γ-Sitosterin, erwies. Den Beweis hierfür erbringen wir im Versuchsteil durch Vergleich der Eigenschaften der freien Sterine und einiger Derivate [Schmelzpunkte, Drehungen und Molekulargewichtsbestimmungen nach Vesterberg[6]) und Sandqvist[7])]. Das Pflanzensterin liegt im Giftsekret frei von Cholesterin und größtenteils unverestert vor. Es besitzt keine meßbare Absorption zwischen 230 und 290 mμ, enthält also kein Provitamin D in nachweisbarer Menge (Messung

---

[1]) R. Hüttel, Aus der Dissertation München. H. Behringer, Aus der Dissertation München.

[2]) Arch. f. exp. Path. **47**, 278 (1902).

[3]) C. r. Acad. Sci. **135**, 49 (1902).

[4]) J. of Pharmacol. **47**, 307 (1933); **49**, 1, 26 (1933).

[5]) H. Wieland, G. Hesse u. R. Hüttel, Liebigs Ann. **524**, 203 (1936).

[6]) Arkiv Kemi, Mineral., Geol. **9**, Nr. 27, 1 (1926).

[7]) Ber. chem. Ges. **63**, 1935 (1930); **64**, 2167 (1931).

von Frl. Dr. F. Pruckner). Dagegen finden K. K. Chen, H. Jensen und A. L. Chen[8]) im Rohsterin aus Bufo-vulgaris-Sekret 4,7% „Ergosterin".

Wir untersuchten auch die Sterine aus den Extrakten der ganzen Häute von Kröten und zwar der Arten B. vulgaris, B. vulgaris formosus (Ostasien) und B. arenarum (Südamerika). Auch hier ließen die Schmelzpunkte der rohen Acetate, die zwischen 120 und 125° lagen, einen Gehalt an Phytosterin vermuten. Da nach unseren Vorversuchen eine Trennung auf chromatographischem Wege wenig aussichtsreich erschien, haben wir das Steringemisch über die bromierten Acetate getrennt[9]). Diese Methode wurde auch von W. Bergmann[10]) zur Aufteilung des „Bombicesterins" (aus dem Seidenraupenöl) in Cholesterin und Sitosterin benutzt. Neben großen Mengen Cholesterin (80—95%) erhielten wir aus dem Hautsterin das gleiche Phytosterin wie aus dem Sekret. Dieses war zu erwarten, da die Häute sowohl die großen Parotiden als auch die kleinen Rückendrüsen noch enthalten hatten. Das eigentliche Körpersterin der Kröten scheint demnach Cholesterin zu sein, jedoch findet sich in den Giftdrüsen der Haut Phytosterin.

Dies ist unseres Wissens der erste Fall, daß im Organismus eines Wirbeltieres ein pflanzliches Sterin aufgefunden werden konnte. Aus den Versuchen besonders von Schönheimer, ferner von Windaus, Dam u. a.[11]), die allerdings nur an Säugetieren und Vögeln durchgeführt wurden, wurde geschlossen, daß der Organismus des Wirbeltieres nicht imstande ist, mit der Nahrung zugeführte Phytosterine zu resorbieren bzw. zu speichern. Unser Befund wirft erneut die Frage nach der Herkunft des Phytosterins auf. Kann die Kröte, als Wirbeltier — im Gegensatz zum Säugetier — Phytosterine aus der Nahrung resorbieren oder synthetisiert sie diese im Organismus? Jedenfalls muß die bisherige Meinung, daß das Cholesterin das ausschließliche Sterin der Wirbeltiere sei[12]), fallen gelassen werden.

[8]) J. of Pharmacol. **47**, 307 (1933).

[9]) Chemikerzeitung **30**, 1011 (1906); vgl. A. Windaus u. A. Hauth, Ber. chem. Ges. **39**, 4378 (1906).

[10]) J. of Biol. Chem. **107**, 527 (1934).

[11]) R. Schönheimer c. s., Diese Z. **180**, 1 (1929); A. Windaus, Arch. Pharmaz. **246**, 121 (1908), Fußnote; H. Dam u. U. Starup, Biochem. Z. **274**, 117 (1934); **278**, 342 (1935).

[12]) Lettré-Inhoffen, Über Sterine, Gallensäuren und verwandte Naturstoffe, Stuttgart 1936, S. 109.

Wahrscheinlich steht das Vorkommen von Pflanzensterin mit der Stellung der Kröte am unteren Ende der Wirbeltierreihe in Zusammenhang; denn noch niedriger organisierte Tiere, z. B. die Seidenraupe[10]), vielleicht auch die Heuschrecke[13]), enthalten Sitosterin (neben Cholesterin), die Auster das Ostreasterin, das dem Sitosterin sehr nahe steht[14]).

Bei dem Versuch zu einer chemischen Systematik der Tierwelt kamen Kutscher und Ackermann[15]) zu einer Einteilung in Kreatinaten = Wirbeltiere und Arginaten (bzw. Akreatinaten) = Wirbellose. Auch hier nimmt die Kröte eine Ausnahmestellung ein. Sie enthält in ihren Giftdrüsen reichlich Arginin, teils frei, teils als Bestandteil ihres Giftstoffes Bufotoxin. In der zitierten Arbeit wird hinsichtlich des Vorkommens von Arginin (und einiger anderer Stoffe) auf eine „Ähnlichkeit zwischen wirbellosen Tieren und Pflanzen gegenüber den Wirbeltieren" hingewiesen. Dies gilt für die Kröte eigenartiger Weise auch hinsichtlich ihrer herzwirksamen Gifte, die bisher in der Tierwelt ohne Beispiel geblieben sind, vielmehr ihre Verwandten in den pflanzlichen Herzgiften besitzen. Vielleicht spielen die Phytosterine eine Rolle bei der Genese dieser Körper. Der Klärung all dieser Fragen käme eine entsprechende Untersuchung anderer Kaltblüter, z. B. von Fröschen, sehr zu statten.

Auch bei der Geburtshelferkröte (Alytes obstetricans), die zu einer anderen Familie (Discoglossidae) gehört, weist die geringe aber sichere Erhöhung des Schmelzpunkts der Sterinacetate (116—117,5°) auf die Anwesenheit von Phytosterin hin. Zu einer Trennung reichte die geringe Materialmenge (120 mg Digitoninfällbares aus 90 Häuten) nicht aus.

Versuchsteil.

Isolierung des Phytosterins aus dem Sekret. Die Petrolätherauszüge von der Giftgewinnung aus dem Sekret wurden zur Trockne verdampft und der Rückstand wiederholt mit kochendem Methanol ausgezogen. Hieraus krystallisierte nach dem Erkalten das rohe Sterin. Durch Adsorption an Aluminiumoxyd aus benzolischer Lösung wurde es weiter gereinigt. Dabei erfolgte die Abteilung der Zonen nach der Liebermann-Reaktion des

---

13) Ch. Kawasaki, J. pharmac. Soc. Japan **56**, 76 (1936).
14) W. Bergmann, J. of Biol. Chem. **104**, 317, 553 (1934).
15) Fr. Kutscher u. D. Ackermann, Z. Biol. **84**, 181 (1926).

Adsorbats und dem Fluorescenzbild unter der Analysenlampe. Die Hauptzone enthielt das Phytosterin. Aus ihr wurde das reine Sterin durch eine zweite Adsorption gewonnen. Ausbeute 2,5 g aus 33000 Kröten.

Isolierung aus den Hautextrakten. Bei Bufo vulgaris und Bufo vulgaris formosus wurde aus den Fettfraktionen in üblicher Weise das Unverseifbare gewonnen, bei Bufo arenarum krystallisierte gleich beim Einengen der alkoholischen Hautextrakte das Rohsteringemisch aus. In allen Fällen wurde nach einmaligem Umkrystallisieren aus Methanol–Petroläther acetyliert und nach dem Verfahren von W. Bergmann[10]) bromiert, vom ausgeschiedenen Dibromcholesterin-acetat abfiltriert und die Mutterlaugen mit Zink und Eisessig in alkoholischer Lösung entbromt. Bei Wiederholung dieses Verfahrens wurde noch etwas Cholesterin abgetrennt. Das erhaltene Phytosterinacetat wurde dann einige Male aus Chloroform–Methanol umkrystallisiert, wobei der Schmelzpunkt noch um einige Grade stieg.

Ausbeuten:	B. vulg.	33 g Rohsterin,	daraus	7,5 g Phytosterinacetat (= 20,5 %)
	B. vulg. form.	30 g „	„	1,6 g Phytosterinacetat (= 5 %)
	B. arenarum (Aus 1500 Häuten)	3,3 g „	„	0,6 g Phytosterinacetat (= 17 %)

Das reine Sterin krystallisiert in dünnen aber breiten Nadeln, die zweiseitig zugespitzt sind und gerade Auslöschung zeigen, nach A. Bömer[16]) charakteristisch für Phytosterin. Cholesterin dagegen zeigt schiefe Auslöschung. Die Liebermann-Reaktion unseres Sterins ist mit der des Cholesterins identisch, ebenso die Reaktion nach Salkowski. Mit Digitonin entsteht eine schwerlösliche Additionsverbindung. Durch katalytische Hydrierung und Titration mit Benzopersäure wurde eine Doppelbindung nachgewiesen.

Analysen:

Sterin: 4,082, 4,117 mg Subst.: 12,570, 12,690 mg CO_2, 4,39, 4,49 mg H_2O.

$C_{29}H_{50}O$ Ber. C 83,98 H 12,16 Gef. C 83,98, 84,06 H 12,04, 12,20.

Sterinacetat: 4,552 mg Subst.: 13,570 mg CO_2, 4,56 mg H_2O.

$C_{31}H_{52}O_2$ Ber. C 81,51 H 11,48 Gef. C 81,29 H 11,21.

---

[16]) Z. Unters. Nahrungsmitt. usw. 1, 21, 532 (1890).

Hydrosterinacetat: 4,288 mg Subst.: 12,820 mg CO_2, 4,56 mg H_2O.
$C_{31}H_{54}O_2$ Ber. C 81,15 H 11,87 Gef. C 81,54 H 11,90.

Molekulargewichtsbestimmung durch Verseifung der Acetate nach Vesterberg-Sandqvist[6, 7]. Vor Ausführung der Bestimmung wurden die Substanzen (ebenso wie zu den Analysen) bei 80° und 0,1 mm getrocknet. Als Berechnungsgrundlage wurde jeweils eine im gleichen Kolben anschließend ausgeführte Blindbestimmung mit derselben Menge Lauge herangezogen (Faktor der Säure 0,1059).

Acetat von	Schmelzp. unkorr.	Einwage in mg	Verbrauch an n/10-HCl		Mol.-Gew.
			i. Blindvers. in ccm	n. Verseif. in ccm	
Cholesterin	114/115	387,9	24,21	15,63	428
		500,0	31,62	20,60	427
Phytosterin (Kahlbaum)	135/136	393,6	24,20	16,03	455
		364,7	22,06	14,56	459
Sterin aus B. vulgaris	136/137	458,7	22,49	13,00	456
		555,0	22,23	10,84	460
Sterin aus B. vulg. form.	135/136	408,4	24,19	15,63	451
		441,9	22,06	12,94	457
Sterin aus B. arenarum	134/135	410,9	22,23	13,60	450
		330,4	21,47	14,53	450

Molekulargewicht berechnet für $C_{27}H_{45}O \cdot CO \cdot CH_3$ . . 428
$C_{29}H_{49}O \cdot CO \cdot CH_3$ . . 456
Mittelwert unserer Bestimmungen. . . . . 455,5.

Derivate. Nach bekannten Methoden wurden dargestellt: Acetat, Benzoat, Dihydrosterin, Dihydrosterin-acetat und Dihydroketon. Ihre Eigenschaften sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt. Ebenso haben wir die des aus Kröten gewonnenen Cholesterins angefügt. Die Angaben der Literatur über Schmelzpunkte und Drehungen für das aus verschiedenen Pflanzen gewonnene Sitosterin und sogar für das einigermaßen sichergestellte γ-Sitosterin weichen z. T. erheblich voneinander ab. Der Grund hierfür ist in schwer abzutrennenden Beimengungen zu suchen. Wir halten deshalb die Übereinstimmung unserer Daten mit den angegebenen für genügend.

Alle Drehungen sind in Chloroform gemessen, die des Krötencholesterins in Äther.

Herkunft	Sterin		Acetat		Dihydrosterin		Dihydrosterin-acetat		Benzoat Schmp.	Dihydro-keton Schmp.
	Schmp. °	α_D °	Schmp. °	α_D °	Schmp. °	α_D °	Schmp. °	α_D °	°	°
B. vulgaris (Sekret)	145/146	−37,7	137	—	139/140	—	137/138	+10,8	152	157/158
B. vulgaris (Häute)	145/146	−37,2	136/137	−41,4	140/141	+25,2	137	+ 8,5	—	—
B. vulgaris formosus	146/147	−39,5	136/137	−42,6	138/139	+24,7	138/139	+11,0	—	—
B. arenarum	145/146	−39,7	135/136	−42,2	—	—	137/138	+ 9,1	—	—
Cholesterin aus Kröten	147/148	−36,4	113/114	−43,0	—	—	—	—	—	—
γ-Sitosterin aus Weizenkeimöl[17]	147/148	−42,0	135/136	−41,0	—	—	—	—	—	—
γ-Sitosterin aus Kornöl[18]	145/146	−42,4	137	−42,7	—	—	143	+ 9,0	—	—
γ-Sitostanol [natürlich.[19]]	—	—	—	—	138/139	+25	138	+14,4	—	—
Sitostanol [aus Sitosterin[20]]	—	—	—	—	141	+24,2	138/139	—	—	—

[17]) R. J. Anderson, J. Amer. Chem. Soc. **48**, 2976 (1926).
[18]) Derselbe, J. Amer. Chem. Soc. **48**, 2987 (1926).
[19]) Derselbe, J. Amer. Chem. Soc. **46**, 1450 (1924).
[20]) Derselbe, J. Amer. Chem. Soc. **46**, 1953 (1924).

Lebenslauf.

Am 22. Mai 1911 wurde ich als Sohn des Oberpostrats Konrad Behringer und seiner Frau Marie-Salesia, geb. Frosch, in München geboren. Nach dem Besuch der Volksschule trat ich in das Progymnasium Schäftlarn ein, das ich aber bald, nach dem Tode meines Vaters, verließ, um zunächst zwei Klassen des Ludwigsgymnasiums in München zu besuchen. Ich trat dann in die Ludwigs-Kreisrealschule in München über und legte im Frühjahr 1931 an der Oberrealschule III in München die Reifeprüfung ab. Hierauf widmete ich mich dem Studium der Chemie an der Universität in München, wo ich zu Beginn des Wintersemesters 1933 das erste und Ende des Sommersemesters 1935 das zweite Verbandsexamen ablegte, um anschließend mit der Ausführung meiner Doktorarbeit zu beginnen.